

ゴマリグナン類の分別定量法および 血清中リグナン類の定量法の検討

辻原命子・福田靖子

Quantitative Determination of Each Sesame Lignan in Food and Serum of Rats by HPLC

Nobuko TSUJIHARA and Yasuko FUKUDA

Abstract

The health-promoting effect of sesame lignans has been clarified, and the concern about lignans is recently increasing. Herein the method of quantification of lignans in foods using UV spectrometry and HPLC was examined. Examination with a fixed quantity of the sesamine, sesamol revealed that ethyl acetate was superior to 80% ethanol for extraction. The separation was good with a reverse negative-phase (ODS) system in comparison with a fixed positive-phase (silica) system. The possibility of measuring lignans in the serum of the rat orally administered the lignans with herb oil and a fluorescence detector of high sensitivity was examined. However, the lignans administered in a fixed quantity to the rat could not be detected in the serum by UV spectrometer with a high-sensitivity fluorescence detector.

緒 論

現在、日本の市場に出回っているゴマのほとんどは栽培種、*Sesamium Indicum* Lである。しかし、最近、リグナン類のさまざまな健康効果が明らかにされ、高リグナン品種への関心が高まってきて、栽培種以外の他品種も少しずつ栽培されたり、食品化されたりしている。

ゴマの発祥地と推定されているアフリカのサバンナ地帯には、*S. alatum*, *S. angolense*などの40種近くの野生種の存在が、小林ら¹⁾により明らかにされ、新しいリグナン類が同定されている。栽培種の*S. Indicum* Lに含まれているリグナン類の種類とそのおよその含量を表1にまとめた²⁾。栽培種に普遍的にしかも量的にも多く含まれているリグナンは、セサミン、セサモリンである。これら2つのリグナンとも極性は低く、脂溶性である。その他のリグナン類は、セサミンまたはセサモリンの一方、または両方のメチレンジオキシ基が開環したりリグナンフェノール類となっているものが多く、極性は高くなる。これらリグナンフェノール類は、種子中では大部分が糖と脱水縮合した配糖体となっている。立体異性体を別にすると、これまでに種子中

表 1 ゴマリグナン類の最大吸収波長及び分子吸光係数

リグナンノ種類	UV吸収	分子吸光係数(log ε)	蛍光(Ex.Em.)	文 献
sesamin	238, 288		287, 321	
sesamol	238, 290		289, 335	
sesaminol	235, 290	235(3.81), 290(3.75)MeOH		Katuzaki
	238, 295	238(3.99), 295(4.17)CHCL 3		Y.Fukuda1986
		295(3.85)CHCL 3		M.Nagata
6-episesaminol		295(3.84)CHCL 3		M.Nagata
diasesaminol		295(386)CHCL 3		M.Nagata
sesamol	230, 286	230(3.80), 286(3.70)MeOH		Katuzaki
piperitol	233, 284	233(4.07), 284(3.90)MeOH		Katuzaki
pinoresinol	235, 280	235(3.81), 280(3.74)MeOH		Katuzaki
sesaminol 1	233, 290	236(3.80), 290(3.82)MeOH		Katuzaki
sesaminol 2	240, 293			栗山健一
sesaminol 2	236, 290	236(4.0), 290(3.94)MeOH		Katuzaki
sesaminol 2'	238, 292			LIA Monzzami
sesaminol 3	239, 293			栗山健一
sesaminol 3	235, 288	235(3.97)288(3.88)		Katuzaki
sesaminol 3'	238, 291			LIA Monzzami
pinoresinol 1				
pinoresinol 2	229, 280			栗山健一
pinoresinol 2	229, 279	226(4.22), 278(3.78)H ₂ O 229(4.16), 279(3.708)90%EtOH		Katuzaki
pinoresinol 2'		225(4.25), 276(3.7)MeOH		Katuzaki
pinoresinol 3	228, 278	228(5790), 278(15820)H ₂ O		Katuzaki
pinoresinol 3	229, 280			栗山健一
piperitol 2	232, 282			栗山健一
sesamol	235, 290			栗山健一
sesamol	230, 285			栗山健一

より見出されたリグナンフェノール類は、7種が明らかにされている^{3, 4, 5)}。また勝崎⁶⁾によれば、血中には微量のリグナンが溶解していると報告している。本実験では、代表的3種のリグナンの分別定量及びまだ報告のない血中リグナンの定量を、高感度の蛍光検出器を用い、ハーブ添加油を混合した飼料を投与したラットの血清中リグナン類およびその代謝物の検出が可能か否かを検討した。

実 験 方 法

1) セサミン・セサモリン・セサミノールの定量

① 試料の調製法

ゴマ種子中ではセサミンが約0.3%、セサモリンが約0.2%、セサミノールが約0.005%程度と極めて微量である。セサミノール他、ピノレシノール、セサモリノール、ピペリトールなどもセサミノールと類似の化学構造を有し微量である。しかし、セサミノールやピノレシノールは、結合型としてかなり含まれていることが明らかになってきた^{7, 8, 9)}。セサミン、セサモリンは低極性であり、セサミノールも比較的極性が低く、生理的機能が明らかにされているので、ここでは3種の代表的リグナンの同時定量について検討した。抽出溶媒は、低極性から中程度の極性成分まで広く溶解しうる酢酸エチルと安本ら¹⁰⁾がスクリーニングに用いた80%エタノールで比較した。図1にゴマ種子を用いた場合の試料調製法をまとめた。

② 定量法

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)移動相(溶離液)は、固定相がシリカ系では、ヘキサン-酢酸エチルを使用し、ODS系では、水-メタノール、または水-アセトニトリルを使用した。検出器;UV(280nmまたは290nm)または蛍光検出器(sesamin, sesamolinでは, Ex.290nm, Em.330nm)

②-1 固定相が逆相(ODS系)カラムの場合

固定相;Develosil ODS-UG 5 (4.6 ϕ x250mm), NomuraChem.Co. 溶離液;メタノール:蒸留水(8:2), 流速;0.8ml/min. 検出器;UV検出器(280nmまたは290nm)または蛍光検出器(Ex.290nm, Em.330nm)

②-2 固定相が順相(シリカ系)カラムの場合

固定相;Develosil60-5 (4.6 ϕ x250mm), NomuraChem.Co. 溶離液;ヘキサン:酢酸エチル(8:2), 流速;1.5ml/min. 検出器;UV検出器(280nmまたは290nm)

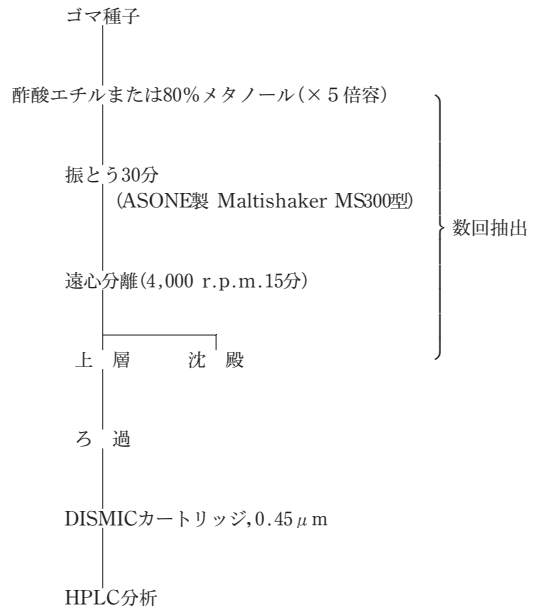


図1 ゴマ種子およびゴマ製品のリグナン定量のための試料調製法

極性リグナンフェノール類(セサミノール・ピペリトール・セサモリノール)はゴマ種子を粉碎後、ヘキサンで脱脂し、脱脂カスを80%エタノールで抽出、次に酵素(β -glucosidase)処理後、酢酸エチルで抽出した溶液についてHPLC ODS系カラム(メタノール/蒸留水 6/4)で分離し定量する方法、また結合型(配糖体)リグナンフェノール類は①酵素(β -glucosidase)処理後、遊離リグナンフェノール類を定量する方法、②結合型リグナンフェノールの分子吸光係数(ϵ 値)から算出する方法がある。試料とする。勝崎ら¹¹⁾により検討されているセミノール配糖体については、Yung-Shin Shyu ら¹²⁾はHPLCを用い、ODS系セミ分取(20mmI.D. x 250mm)カラム、流速 5.0ml/min、濃度勾配(40%~90% methanol/60min)の条件でsesaminol triglucoside RT37.9 min, sesaminol diglucoside RT42.8 min.で分離定量し、LI A. Monzzamiら¹³⁾は、ナリンゲニン(naringenin)を内部標準品とし、ヘキサン・2プロパノール系溶媒で脱脂後、85%エタノールで抽出したものについて、ODS系カラムを用い、移動相を濃度勾配(5%アセトニトリルを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH2.8)-アセトニトリル)として sesaminol triglucoside 3, sesaminol diglucosideを分離定量している。

勝崎ら¹¹⁾の報告では、下記のように試料を調製し、HPLCを用いて定量している。

① 試料調製法

ゴマ種子を試料とした場合には粉碎後、ヘキサンで脱脂する。脱脂カスを80%エタノールで抽出し、酵素(β -glucosidase)処理後、酢酸エチルで抽出した溶液を試料とする。

② 定量法

高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

固定相は、ODS系セミ分取カラム、移動相はメタノール/水 (V/V) = 6/4を使用

検出波長；UV280nm

2) 生体試料中リグナンの定量

① 生体試料の調製

生後6週齢のWistar系、雄ラットを用い、高リグナン種のゴマを10%添加した飼料を3週間(21日)、経口的に投与した。飼育終了後、ラットに軽いエーテル麻酔を施し、屠殺解剖した後、採血し、3,000r.p.m.で10分間遠心分離(KUBOTA 5200)して血清を採取した。分離した血清は、冷却遠心機(KUBOTA 3780)を用い、12,000r.p.m. 4℃で15分間遠心分離をした。遠心分離した上澄は、さらにDismic 13HP 0.45 μm (ADVANTEC)を用いてろ過した後、HPLCサンプルとし、リグナン類の定量に用いた。

② 定量法:HPLC Shimadzu LC

固定相；Develosil ODS-UG 5 (4.6 φ x 250mm), NomuraChem.Co.

溶離液；メタノール：蒸留水 (75:25), 流速；0.8ml/min.

検出器；蛍光検出器 (Ex.290nm, Em.330nm)

Shimadzu RF-535Response Medium, Range16,Sensitivity High

結 果

1. 抽出溶媒—酢酸エチルと80%エタノール—の検討

同一粉碎試料を用いて、酢酸エチルと80%エタノールで各3回抽出した場合の定量値(セサミンとセサモリン)を比較すると、セサミンではエタノール抽出は、酢酸エチル抽出の約94.36%、セサモリンでは約87.5%であった。セサミンよりも極性の低いセサモリンの方が抽出力は低い。この結果から、酢酸エチルが抽出溶媒として優れていることが示唆された。育種過程など、試料数が多く、迅速な定量を要する場合は、80%エタノール抽出の方が脂溶性成分の影響は少ない。

2. 食品中リグナン類の検出

食品中(ゴマ種子中)のリグナンの定量については、これまで行ってきたHPLCによる分離定量法・常法：UVスペクトロメータ法-を用いた。

セサミン、セサモリン、セサミノールは、本研究室でゴマまたはゴマ油より精製し、MS,H-NMR,13C-NMRで化学構造を確認した純度97%のものを、2～5点検量線を作成し、定量した。固定相として、順相(シリカ系)(図2)、逆相(ODS系)(図3)ともセサミン、セサモリンの分離は良好であった。

3. 市販ゴマ油中のリグナン類の分別定量

ゴマ油の場合は、ゴマ種子に比べて、セサミン、セサモリンは約2倍量になっているので、イソオクタンまたは酢酸エチルで10倍容に希釈して測定した。ゴマサラダ油は、油精製過程で、リグナン類が大きく変化し、セサミンの約1/2がエピセサミンとなり、HPLCでの定量ではセサ

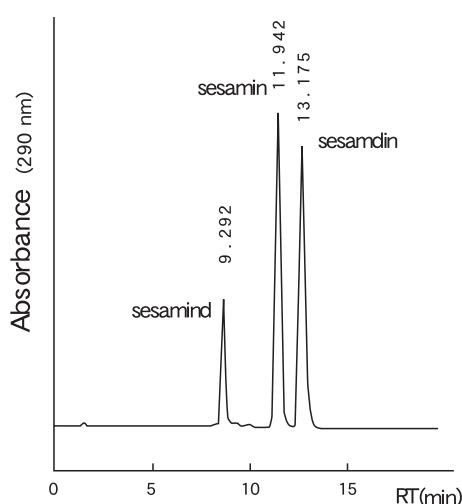


図2 HPLC(逆相カラム)によるセサミン・セサモリン・セサミノールの分離定量

固定相; Develosil ODS-UG 5 (4.6φx250mm), NomuraChem.Co.
 溶離液; メタノール: 蒸留水 (8:2),
 流速; 0.8ml/min.
 検出器; UV検出器 (290nm)

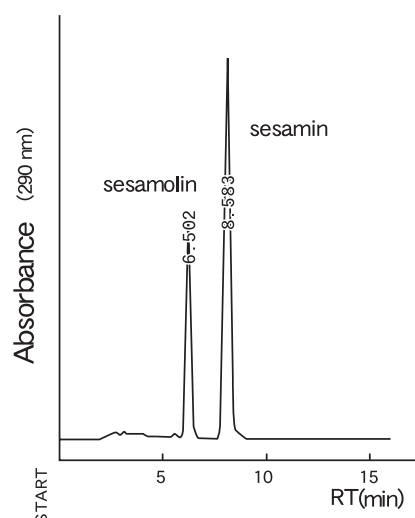


図3 HPLC(順相カラム)によるセサミン・セサモリンの分離定量

固定相; Develosil60-5 (4.6φx250mm), NomuraChem.Co.
 溶離液; ヘキサン: 酢酸エチル (8:2),
 流速; 1.5ml/min.
 検出器; UV検出器 (290nm)

ミンとセサモリンのRTの間にピークが1本見出される。しかし、セサモリンは検出されなかった。セサミノールは、ゴマサラダ油製造過程で立体構造の異なる3種の異性体となっている6)ので、HPLCの逆相系で定量する場合、セサミンのピークの前に3異性体のピーク(セサミンの1/5~1/10量)が認められた。

市販ゴマ油8社について、リグナンを定量した結果、表2にまとめたように、セサミンと立

表2 市販ごま油のリグナン含量と色

会社	種 類	リグナン (mg/ml)					色(褐変度)* (420nmの吸光度)
		セサミン	エビスセサミン	セサミノール	セサモリン	セサモール	
A	純正ごま油	6.00	n.d.	n.d.	2.81	trace	0.202
B	生搾り純正ごま油	1.26	1.24	0.38	0.13	n.d.	0.026
C	純正黒ごま油	4.97	n.d.	n.d.	2.77	trace	0.262
D	純正香りひき立つごま油 深煎り胡麻の香ばしさ	5.90	n.d.	n.d.	2.92	trace	0.309
E	香り焙煎 純正一番しぼり	6.26	n.d.	n.d.	3.57	trace	0.222
F	伝統的な压榨法 純正 胡麻油	4.54	n.d.	n.d.	2.38	trace	0.369
G	純正 ごま油	4.58	n.d.	n.d.	2.91	trace	0.196
H	台湾風味 中国料理用 純黒ごま油	3.77	n.d.	n.d.	1.68	trace	0.465
I	韓国産 ごま油	5.96	n.d.	n.d.	2.62	trace	0.450
J	極上胡麻油	3.36	2.09	0.46	0.79	—	0.078
K	太白胡麻油	2.58	2.34	0.68	0.04	n.d.	0.012
	M±SD	4.47±1.53	1.89±0.47	0.51±0.12	2.05±1.16	—	0.236±0.149

: 酢酸エチルにて10倍に希釈し測定

体異性体であるエピセサミンを合計すると平均で $5.27 \pm 3.77 \text{ mg/ml oil}$ となり、セサミノールは、エピセサミンの検出されたゴマサラダ油系またはゴマサラダ油混合系でセサミンの1/10量、 $0.51 \pm 0.12 \text{ mg/ml oil}$ 含まれていた。セサモリンは $2.05 \pm 1.16 \text{ mg/ml oil}$ であり、セサミンの1/2量以下であった。E社の純正1番しぼりはセサミン6.26, セサモリン3.57 (mg/ml oil) と8社のうち最も含量が多かった。B社は、ゴマサラダ油タイプであり、セサミン2.49, セサミノール0.38, セサモリン0.13 (mg/ml oil) と総リグナン量は最も少なかった。エピセサミン, セサミノールを含む3社は、いずれも褐変度が低く、淡白な色であり、使用できる用途も広がることから、機能性の高い油であることが明らかとなった。

4. 血清中のリグナン類の検出

勝崎⁶⁾は、ゴマ投与ラットのセサミノールについて検討し、HPLCの検出器としてECD (電気化学検出器)を用い、ODS系で、酸化電位500mVにした場合、セサミノールのピーク面積が最大となり、UV検出器の場合に比べて、135倍高感度に定量可能と報告している。

ゴマリグナン類は蛍光物質であり、蛍光検出器を用いると、血清中などの微量のリグナン類を定量できる可能性がある。本研究室での予備的検討で

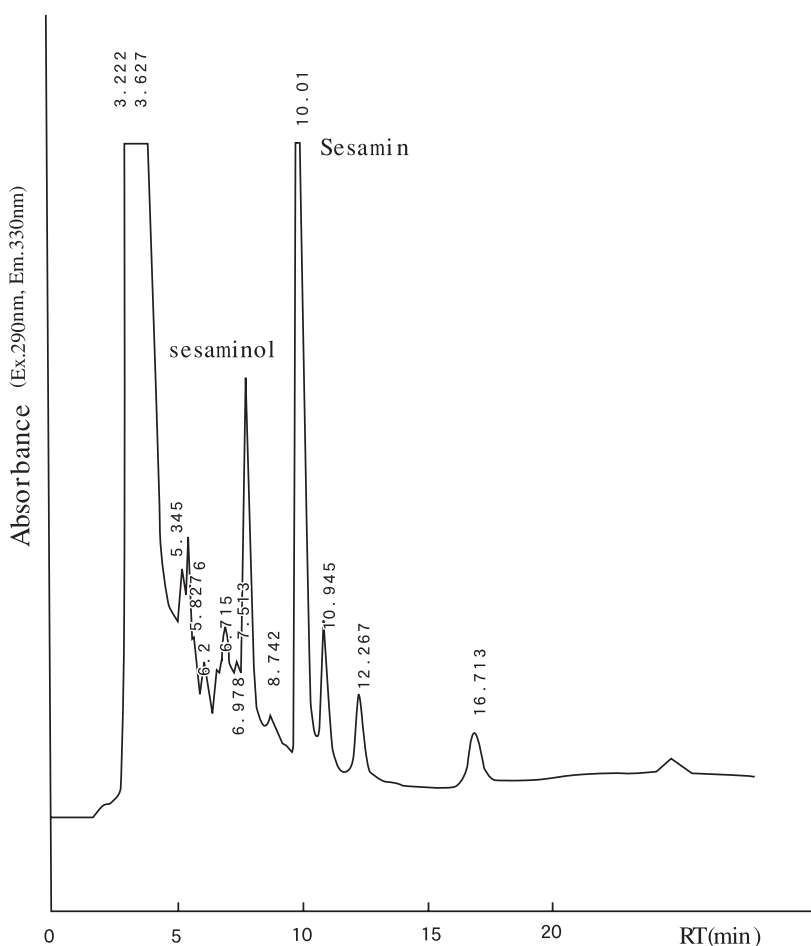


図4 ハーブ添加油 (アニス20%) 投与ラットの血清中リグナンの検出
固定相; Develosil ODS-UG 5 (4.6 ϕ x250mm), NomuraChem.Co.
溶離液; メタノール: 蒸留水 (75:25), 流速; 0.8ml/min.
検出器; 蛍光検出器 (Fluorescence) (Ex.290nm, Em.330nm)

は、セサミンの場合、蛍光検出器を用いることにより、UV検出器による定量法に比べて1000倍以上の感度であった。蛍光物質の多い血清などの試料では、分離定量が不可能な場合もあることから、今回は、ゴマサラダ油にハーブを添加したハーブ添加油を混合した合成飼料を投与したラットの血清を用いて、ゴマリグナン類（セサミン、セサミノール）の検出が可能か否か検討した。

その結果、UV検出器では検出が十分でない血清中のリグナンの定量分析が高感度で定量可能であることが示唆された。（図4）

謝 辞

本研究を行うにあたり、ご協力いただきました七野知子様に謝意を申し上げます。

文 献

- 1) 小林貞作「ゴマの来た道」岩波書店（1986）
- 2) Y. Fukuda and M. Nagashima: Antioxidative Function of Seeds (Nuts) of Seeds (Nuts) and Their traditional Oils in the Orient, Edt, J. Shi, Chi-Tang Ho, F. Shahidi, Asian Functional Foods, CRC Press 381-409 (2005)
- 3) Y. Fukuda, T. Ozaki, T. Osawa and M. Namiki: Studies on Antioxidative Substances in Sesame Seed, *Agric. Biol. Chem.*, **49** (2), 301-306 (1985)
- 4) Osawa, T., Nagata, M., Namiki, M. and Fukuda, Y: Sesamol, a Novel Antioxidant Isolated from Sesame Seed, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3351-3352 (1985)
- 5) Y. Fukuda, M. Nagata, T. Osawa and M. Namiki: Contribution of Lignan Analogues to Antioxidative Activity of Refined Unroasted Sesame Seed Oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **63**, 1027-1031 (1986)
- 6) 勝崎裕隆:「新規リグナン配糖体の構造と機能」博士論文, 名古屋大学 (1993)
- 7) H. Katsuzaki, M. Kawasumi, S. Kawakishi, and T. Osawa: Structure of Novel Antioxidative Lignan Glucosides Isolated from Sesame Seed, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56** (12), 2087-2088 (1992)
- 8) H. Katsuzaki, S. Kawakishi, and T. Osawa: Structure of Novel Antioxidative TriGlucoside Isolated from Sesame Seed, *Heterocycles* **36** (5), 933-936 (1993)
- 9) H. Katsuzaki, S. Kawakishi, and T. Osawa: Structure of Novel Sesamol Glucosides in Sesame Seed, *Phytochemistry* **35**, 773-776 (1994)
- 10) Shirato-Yasumoto et al (2003) A simplified HPLC Quantification of sesamin and sesamol in sesame seed, *SABRAO J. of Breeding and Genetics*, **35** (1), 27-34 (2003)
- 11) 勝崎裕隆:「新規リグナン配糖体の構造と機能」*Foods Food Ingredients, J. Jpn.*, **211** (6), 533-540 (2006)
- 12) Yung-Shin Shyu, Lucy Sun Hwang: Antioxidative activity of the crude extract of lignan glycosides from unroasted Burma black sesame meal, *Food Research International* **35**, 357-365 (2003)
- 13) LIA. Monzami, Rolf E. Andersson, and Afaf Kamal-Eldin: HPLC Analysis of sesamol

Glucosides in Sesame Seeds , J.Agric.Food Chem., **54**, 633-638 (2006)

- 14) Fukuda, Y., Isobe, M., Nagata, M., Osawa, T. and Namiki, M.: Heterocycles, **24**, 923 (1986)